DARSTELLUNG VON REINEM D–GLUCOSON

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Paul Schlimmer

Saarbrücken
1973

AUS DER FACHRICHTUNG PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
DES FACHBEREICHS 3 - THEORETISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

DARSTELLUNG VON REINEM D-GLUCOSON

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

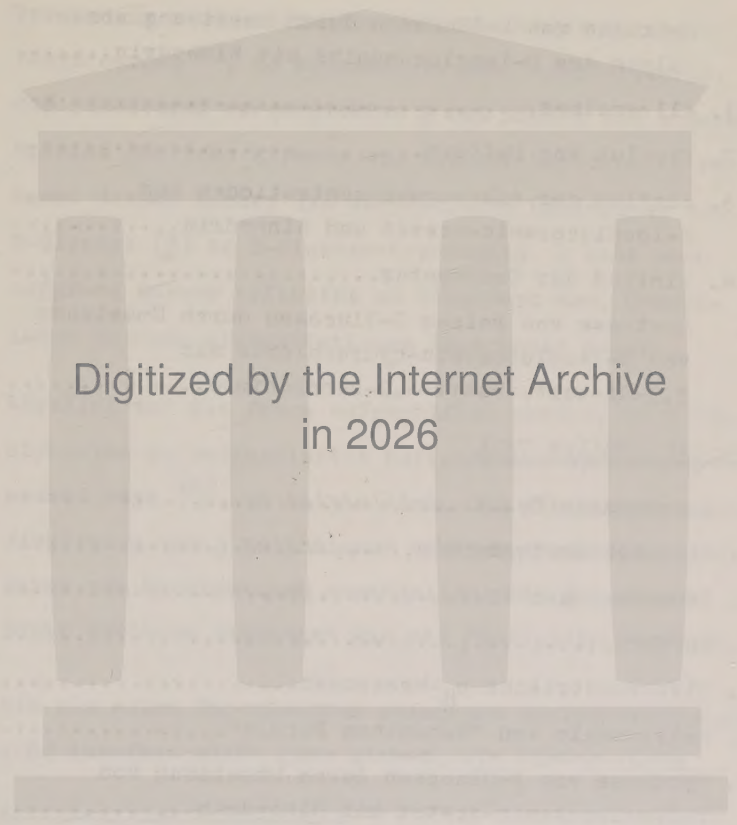
vorgelegt von

PAUL SCHLIMMER
geb. am 8. Juni 1948 in Zweibrücken

Dekan: Professor Dr. med. G. A. JUTZLER
Referent: Professor Dr. rer. nat. H. J. HAAS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 16. November 1973 abgelegt.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542725_0070

INHALTSVERZEICHNIS

EINFÜHRUNG..... 3

THEORETISCHER TEIL

1. Synthese von D-Glucoson durch Umsetzung von Salzen des D-Isoglucosamins mit Ninhydrin..... 7

1.1. Allgemeines..... 7

1.2. Einfluß von Puffern..... 9

1.3. Einfluß der Ausgangskonzentrationen von D-Isoglucosamin-acetat und Ninhydrin..... 13

1.4. Einfluß der Temperatur..... 17

2. Synthese von reinem D-Glucoson durch Umsetzung von D-Isoglucosamin-hydrochlorid mit 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon..... 17

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Ausgangsstoffe..... 21

2. Papierchromatographie..... 21

3. Ionenaustauscher..... 22

4. Puffer..... 23

5. Elektrometrische p_H-Messungen..... 24

6. Natriumsalz von "Ruhemanns Purple"..... 24

7. Synthese von D-Glucoson durch Umsetzung von D-Isoglucosamin-acetat mit Ninhydrin..... 25

8. Synthese von reinem D-Glucoson durch Umsetzung von D-Isoglucosamin-hydrochlorid mit 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon..... 27

ZUSAMMENFASSUNG..... 29

LITERATURVERZEICHNIS..... 30

EINFÜHRUNG

Über die biologischen Wirkungen des D-Glucosons [+] (2) und die Möglichkeiten seiner therapeutischen Verwendung sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden [2]. So beobachtete man beispielsweise, daß parenteral verabreichtes 2 bei Mäusen und anderen Spezies ähnliche Effekte wie Insulin hervorruft. Ferner hemmt dieser Zucker die enzymatische Umwandlung von D-Glucose (3) in D-Glucose-6-phosphat. 2 kann auch aufgrund seiner Affinität zu Blausäure bzw. Cyanidionen Blausäureintoxikationen rückgängig machen.

Kürzlich ist die Frage aufgegriffen worden, ob 2 die Glykolyse in perfundierten Rattenlebern spezifisch hemmen kann [12]. Es zeigte sich, daß diese Organe bei Einwirkung von 2 Kaliumionen verlieren und unter Aufnahme von Natriumionen anschwellen. Mit 2 kann man daher ähnliche Wirkungen wie mit Phalloidin erzeugen [11].

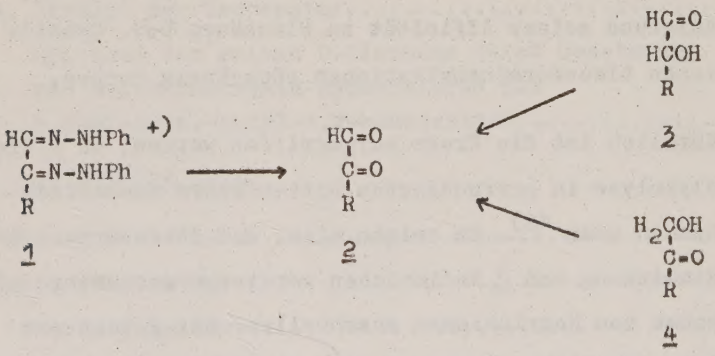
Die aus allen Experimenten gezogenen Schlußfolgerungen sind insofern nicht ganz sicher, als bisher stets

---

+) Die Substanz ist korrekterweise [16] als D-arabino-2-Hexosulose zu bezeichnen. Der Einfachheit halber wird hier der früher übliche Name "Glucoson" verwendet.

Glucosonpräparate benutzt wurden, deren Reinheit fraglich war. Es schien daher sinnvoll, reines 2 zu synthetisieren und dieses bezüglich seiner Wirksamkeit zu überprüfen.

Bei den wichtigsten der bisher üblichen Verfahren zur Herstellung von 2 ging man entweder von D-Glucose-phenylosazon (1), von 3 oder von D-Fructose (4) aus. E. FISCHER [8], der erstmals 2 darstellte, erhielt es bei der Behandlung von 1 mit rauchender Salzsäure.



-R= -CHOH-CHOH-CHOH-CH_2OH (D-arabino)
Ph= -C_6H_5

Anstelle von Salzsäure wurden auch Brenztraubensäure [5] oder Benzaldehyd [1] verwendet. Durch Oxydation von 3 oder 4 mit Kupfer(II)-acetat [26] oder Fentons

---

+) Wegen besserer Übersichtlichkeit werden die Zucker in offenkettiger Form geschrieben.

Reagenz [22] gelangt man ebenfalls zu 2.

Mit Hilfe der genannten Methoden erhält man nur schwer oder überhaupt nicht zu reinigende Glucosonpräparate. Dies beruht vermutlich darauf, daß man während der Synthesen erhitzen muß und dabei das bereits entstandene 2 komplexe Gemische von Glucoson-Abkömmlingen bzw. -Zersetzungsprodukten ergibt.

Da man während der Herstellung von 2 Wärme vermeiden wollte, hat man reines 2 durch mikrobiologische Oxydationen von 3 oder anderen Kohlenhydraten darzustellen versucht [3]. Jedoch erhielt man auch hier, d. h. beim Arbeiten bei Zimmertemperatur, nur unreine Produkte.

Es wurde daher versucht, 2 auf ausschließlich chemischem Wege, aber bei niedriger Temperatur zu synthetisieren.

E. NEUZIL, J.-C. BRETON und H. PLAGNOL [23] erhielten bei 20° aus α-Aminoketonen und Ninhydrin (Triketohydrinden-hydrat, 6, Seite 8) die entsprechenden α,ß-Diketone und "Ruhemanns Purple" (Diketohydrindyliden-diketohydrind-amin, 10, Seite 8), eine violette Substanz, die auch bei Reaktionen von 6 mit zahlreichen anderen Aminen gebildet wird.

Ausgehend von Salzen des D-Isoglucosamins (1-Desoxy-1-amino-D-fructose) +) sollte man auf analoge Weise, d. h. mittels einer "nichtenzymatischen Transaminierung", zu 2 gelangen. Die Umsetzung lief jedoch bei 20° nur träge ab und ergab geringe Ausbeuten an 2, das überdies erst nach einer recht komplizierten Abtrennung der übrigen Reaktionsprodukte rein zu erhalten war. Aus diesem Grunde wurde nicht versucht, größere Mengen an reinem 2 auf diesem Wege zu gewinnen.

Es gelang jedoch, reines 2 durch Umsetzung von Salzen des Isoglucosamins mit 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon (15, Seite 19) zu erhalten. 15 war bei der schon bei 20° schnell ablaufenden Oxydation primärer Amine zu den entsprechenden Ketoverbindungen, vor allem im Zusammenhang mit der Synthese von Prostaglandinen, verwendet worden [6]. 2 konnte auf diesem Wege in größeren Mengen hergestellt werden, ohne daß komplizierte Reinigungsverfahren notwendig waren. Durch Reaktion von Salzen des Isoglucosamins mit 15 gewonnenes 2 erwies sich bei der Perfusion von Rattenlebern im Vergleich mit Präparaten, die aus 1 dargestellt worden waren, als deutlich besser wirksam [13].

+) Der Einfachheit halber wird im folgenden Text das Präfix "D-" weggelassen.

THEORETISCHER TEIL

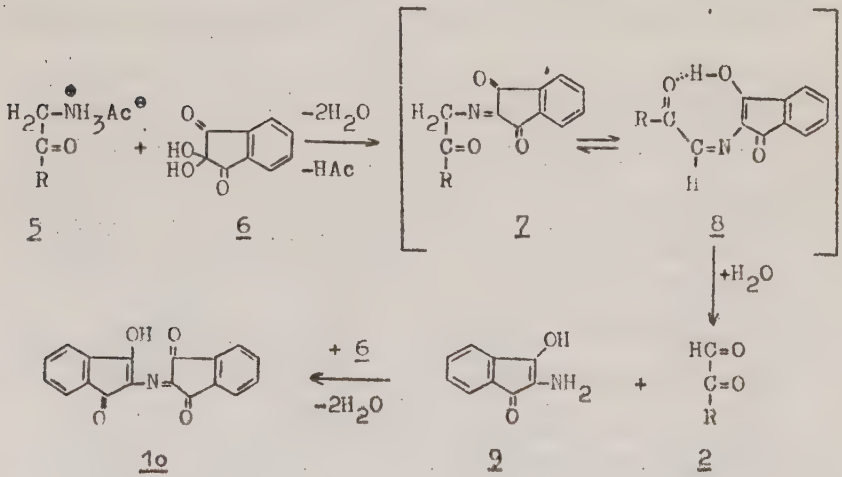
1. Synthese von D-Glucoson durch Umsetzung von Salzen des D-Isoglucosamins mit Ninhydrin

1.1. Allgemeines

Die auf Seite 6 angegebene Übertragung der Synthese von α,ß-Diketonen aus den entsprechenden α-Aminoketonen und Ninhydrin (6) auf die Herstellung von 2 aus Isoglucosamin ist nicht ganz so formal, wie es zunächst erscheint. "Freies" Isoglucosamin (14, Seite 19) ist nämlich bisher nicht bekannt, und es gelang auch nicht, diese Base aus ihren gut zugänglichen Salzen darzustellen [4]. Daher mußten stets Salze des Isoglucosamins eingesetzt werden. Diese liegen in fester Form nicht in der offenkettigen Keto-, sondern in einer cyclischen Halbacetalform vor, was selbstverständlich nicht ausschließt, daß bei der Umsetzung mit 6 die Ketoformen reagieren.

Versetzt man eine wäßrige Lösung von Isoglucosamin-acetat (5) mit 6, so tritt schon nach kurzer Zeit eine schwache Rotfärbung auf; später wird die Lösung intensiv blauviolett. Nach mehreren Stunden ist - papierchromatographisch - neben den Ausgangsstoffen, 2, 10 und eine gelbe Substanz (vgl. Seite 24, 25) feststellbar.

Weil nicht sicher ist, ob 5 als Keton oder als Halbacetal reagiert, ist es schwierig, für die Umsetzung ein bestimmtes Reaktionsschema anzugeben. In Anlehnung an die von E. NEUZIL, J.-C. BRETON und H. FLAGNOL [23] entwickelten Vorstellungen könnte die Reaktion von der Ketoform von 5 ausgehen und auf dem Wege über (hypothetische) Zwischenverbindungen (7 und 8) zu 2 und 9



5 6 7 8 10 9 2

- R= -CHOH-CHOH-CHOH-CH_2OH (D-arabino)
Ac= CH_3COO

führen, das mit weiterem 6 "Ruhemanns Purple" (10) ergeben würde. (Daß 9 in der angegebenen oder einer dazu tautomeren Form Zwischenprodukt der "Ninhydrin-Reaktion"

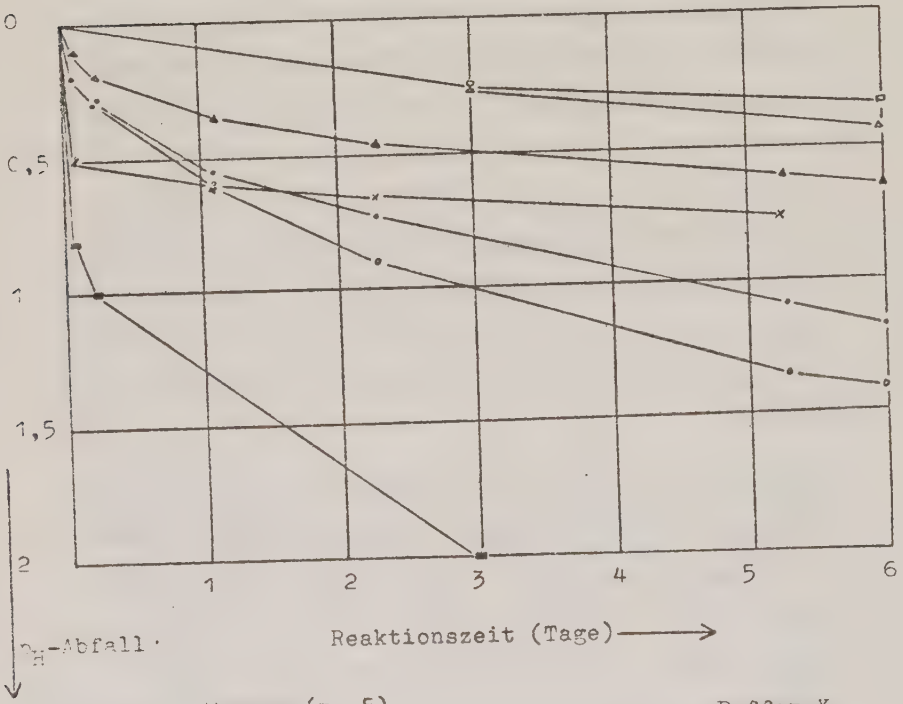
ist, geht aus Arbeiten von D. J. McCALDIN [20] und H. WITTMANN [28] hervor).

1.2. Einfluß von Puffern

Läuft die Reaktion wie in dem auf Seite 8 angegebenen Schema ab, so entsteht 1 Mol Essigsäure pro Mol 2. Tatsächlich sinkt das p_H, wenn die Reaktion in Wasser durchgeführt wird, und parallel dazu nimmt die Umsetzungsgeschwindigkeit ab. Dies spricht dafür, daß nicht 5, sondern "freies" Isoglucosamin (14) mit 6 reagiert, was auch zu erwarten ist, wenn man annimmt, daß die Bildung von 7 unter nucleophiler Verdrängung einer Hydroxylgruppe von 6 durch den Stickstoff des Isoglucosamins abläuft.

Beim Arbeiten in geeigneten Pufferlösungen sollte daher die Reaktionsgeschwindigkeit konstant gehalten werden. Die untersuchten Puffer gehen aus Tabelle 2 (Seite 23) hervor. Am günstigsten erwiesen sich Gemische aus 0,1 m Citronensäure und 0,2 m Dinatriumhydrogenphosphat (Tabelle 2, II und III). Wie aus Abbildung 1 (Seite 30) hervorgeht, sinkt das p_H innerhalb von 6 Tagen bei Verwendung derartiger Puffersysteme nur um etwa 0,4 Einheiten, während in ungepufferten Lösungen innerhalb von 3 Tagen ein Abfall von 2 p_H-Einheiten zu beobachten ist. Die Acidität bleibt bei Verwendung der Puffer II und III also einigermaßen konstant, jedoch entstehen 2 und 10,

Abbildung 1.- p_H-Abfall beim Umsatz von 10^{-4} Mol Isoglucosamin-acetat mit 2 x 10^{-4} Mol Ninhydrin in 7 ml Lösungsmittel bei 20°.



■——■ : Wasser (p_H 5)
△——△ : Puffer II
□——□ : Puffer III
▲——▲ : Puffer VI
x——x : Puffer X
•——• : Puffer VII
•——• : Puffer IX

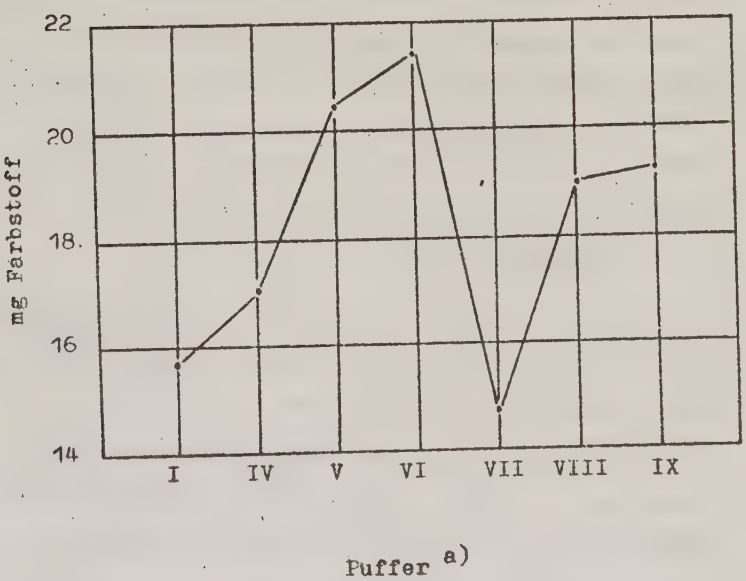
Die Zusammensetzung und die Acidität der Puffer sind aus Tabelle 2 (Seite 23) zu entnehmen.

bzw. dessen Salze, nur in minimalen Ausbeuten. Erst beim Arbeiten bei $p_H > 6{,}6$ und genügend hoher Pufferkapazität steigt die Ausbeute an 2 deutlich an. Optimale Ausbeuten ergeben sich bei Verwendung eines Phosphatpuffers vom p_H 6,9 (Tabelle 2, VI). (Weil 5 und 2 in alkalischen Lösungen instabil sind, wurden Puffer mit einem $p_H > 7{,}44$ nicht untersucht.) Die Ausbeuten an 2 wurden auf papierchromatographischem Wege halbquantitativ ermittelt.

Das p_H-Optimum der Reaktion von 5 mit 6 liegt also wesentlich höher als bei "Ninhydrin-Reaktionen" von Monoamino-monocarbonsäuren.

Führt man die Umsetzung von 5 mit 6 in dem "optimalen" Puffer (VI) durch, so beobachtet man neben einer besonders schnellen Blauviolettverfärbung die Bildung eines roten Niederschlags, bei dem es sich vermutlich um das Natriumsalz von 10 handelt. Die pro Zeiteinheit ausfallende Menge hängt, bei gegebenen Ausgangskonzentrationen von 5 und 6, von dem p_H bei Reaktionsbeginn und der Molarität des Puffers ab (Abbildung 2, Seite 12). Da die Kapazität des Puffers VI bereits nach 1,5 Stunden erschöpft ist, wurde die Umsetzung in konzentrierteren Puffern gleicher Anfangsacidität durchgeführt. Neben der längeren Aufrechterhaltung eines konstanten p_H-Wertes sollte so auch erreicht werden, daß aufgrund der höheren Salzkonzentrationen der Farbstoffausfall und damit ebenso die Ausbeute an 2 gesteigert wird. Solche höhermolaren Puffer

Abbildung 2.- Farbstoffniederschlag nach 48-stündiger Reaktion von 10^{-4} Mol Isoglucosamin-acetat mit 2×10^{-4} Mol Ninhydrin in 7 ml Puffer bei 20°.



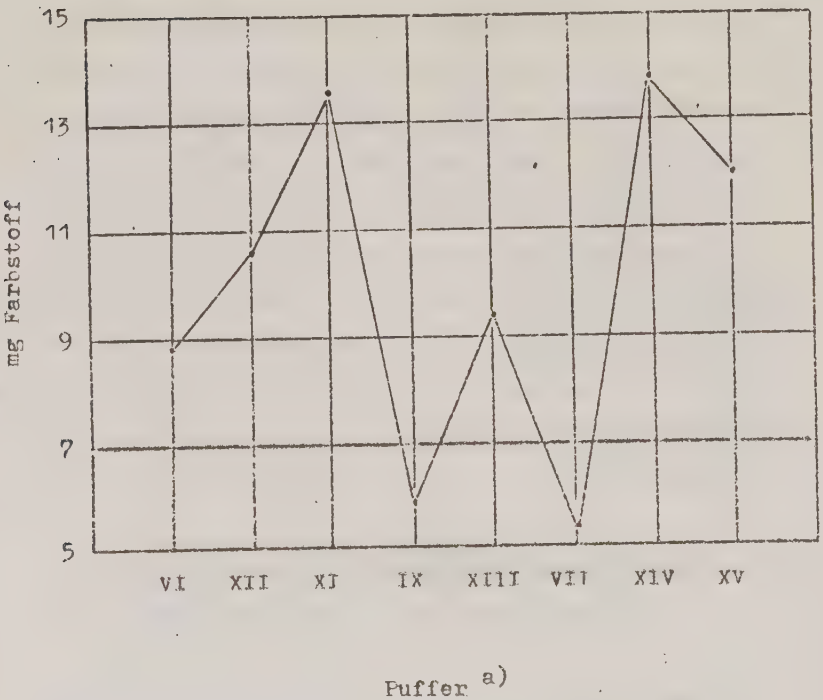
a) Die Zusammensetzung der Puffer ist aus Tabelle 2 (Seite 23) zu entnehmen.

(Tabelle 2, XI-XV) steigern tatsächlich den Farbstoffausfall (Abbildung 3, Seite 14), aber die Bildung von 2 (papierchromatographisch verfolgt) war geringer als bei Verwendung weniger konzentrierter Puffer (Tabelle 2, IV-IX). Versetzt man diese verdünnteren Puffer mit Natriumchlorid, so erhält man ebenfalls einen erhöhten Farbstoffausfall, aber ebenso wie bei Verwendung konzentrierterer Puffer nur geringe Mengen an 2. Sättigt man mit n-Butanol, so ist gleichfalls eine vermehrte Farbstoffbildung zu sehen, aber 2 nimmt, beginnend 3 Stunden nach Versuchsanfang, merklich ab. Daraus ergibt sich, daß 2 durch n-Butanol verändert wird. Ob dies auf der Bildung von Glykosiden beruht, wurde nicht weiter untersucht. Weshalb Erhöhungen der Natriumionen-Konzentration (durch Steigerung der Pufferkapazität oder durch Zugabe von Natriumchlorid) die Ausbeuten an 2 senkt, wurde ebenfalls nicht untersucht.

1.3. Einfluß der Ausgangskonzentrationen von D-Isoglucosamin-acetat und Ninhydrin

Wie zu erwarten war, konnten durch Steigerung der absoluten und der relativen Ausgangskonzentrationen von 5 und von 6 die Ausbeuten an 2 und an 10, bzw. an dessen Salzen erhöht werden. Bemerkenswert ist, daß die Steigerung der relativen Ninhydrinkonzentration, d. h. die Verwendung von überschüssigem 6, günstiger ist, als die

Abbildung 3.- Farbstoffniederschlag nach 9-stündiger Reaktion von 10^{-4} Mol Isoglucosamin-acetat mit 2 x 10^{-4} Mol Ninhydrin in 5 ml Puffer bei 20^{o}.



a) Die Zusammensetzung der Puffer ist aus Tabelle 2 (Seite 23) zu entnehmen.

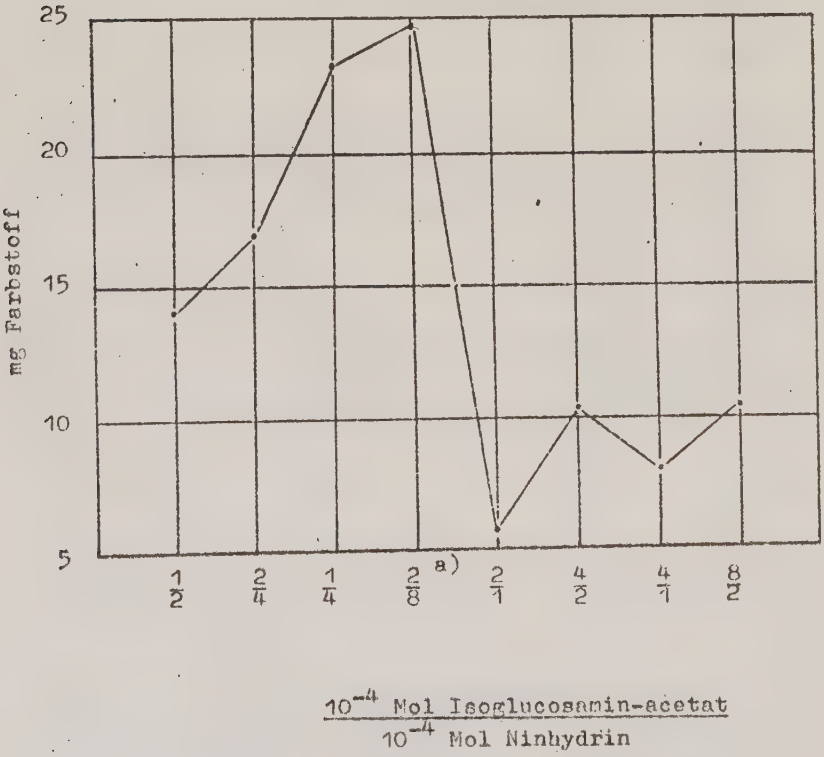
relative Anhebung der Konzentration von 5. In Abbildung 4 (Seite 16) ist dies anhand des Farbstoffausfalls dargestellt. Selbst bei fünffachem Überschuß an 6 gelingt es nicht, den Aminozucker vollständig umzusetzen. Jedoch kann man durch steigende Überschüsse an 5 Ninhydrin immer schneller entfernen (Tabelle 1).

Tabelle 1.- Einfluß des Überschusses an Isoglucosaminacetat auf die zeitliche Abnahme von Ninhydrin. Umsetzung in 3,5 ml Puffer VI (Tabelle 2, Seite 23) bei 20°.

Isoglucosamin-acetat (10^{-4} Mol)	Ninhydrin (10^{-4} Mol)	Stunden a)
1	1,75	135
1	1,50	111
1	1,25	87

a) Zeit, nach der Ninhydrin papierchromatographisch nicht mehr nachweisbar ist.

Abbildung 4.- Farbstoffniederschlag nach 16-stündiger Reaktion von Isoglucosamin-acetat mit Ninhydrin in 7 ml Puffer VI (Tabelle 2, Seite 23) bei 20°.



a) Durchführung im experimentellen Teil (Seite 24)

1.4. Einfluß der Temperatur

Um zu prüfen, ob bei Temperaturerhöhung günstigere Resultate zu erzielen waren, wurde die Reaktion von 5 mit 6 auch bei 40° studiert. (Molverhältnis 1:2, Puffer VI). Unter diesen Bedingungen ist in keinem Stadium der Umsetzung 2 nachzuweisen, obwohl beim Erkalten der Lösung reichliche Mengen an Farbstoff ausfallen. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß 2 auch hier, ebenso wie bei den bekannten Herstellungsverfahren, thermisch verändert wird (vgl. Seite 5). Man muß annehmen, daß 2 vollständig zerstört wird, denn in derartigen Ansätzen können keine definierten oder eventuell zu erwartenden Zerfallsprodukte (D-Arabinose, Glyoxylsäure, Glykolsäure, Oxalsäure) nachgewiesen werden.

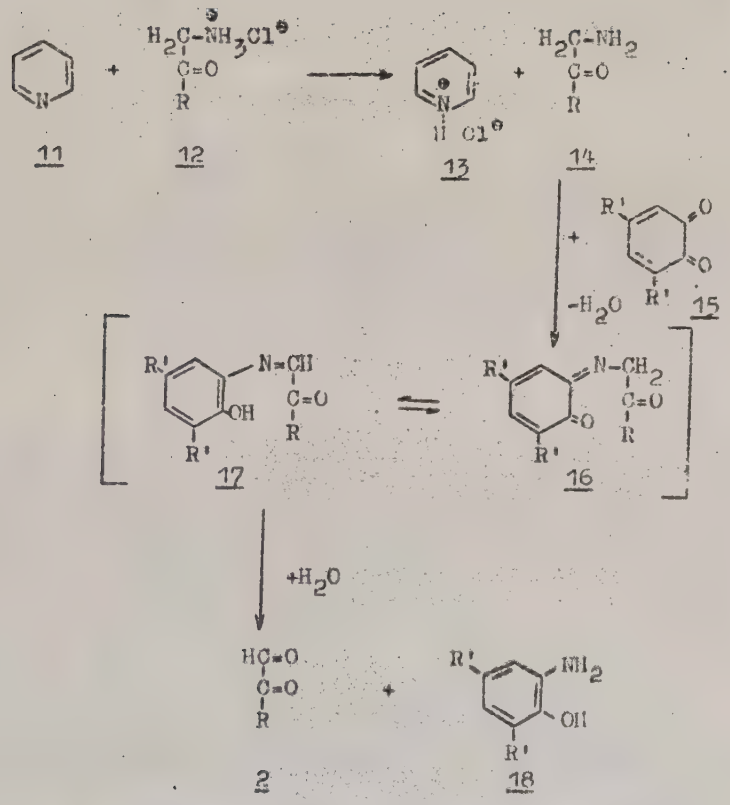
2. Synthese von reinem D-Glucoson durch Umsetzung von D-Isoglucosamin-hydrochlorid mit 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon

E. J. COREY und K. ACHIWA [6] oxydierten primäre Amine mit speziellen Chinonen unter milden Bedingungen zu den entsprechenden Ketonen. Ähnliches beobachteten auch W. FLAIG und H. RIEMER [10]. Als bestes Oxydationsmittel bewährte sich 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon (15) [6]. Die beiden in 15 enthaltenen tert.-Butylgruppen verhindern die bei

einfachen Chinonen eintretende Addition der primären Amine, gestatten aber die Bildung Schiffscher Basen, die zu den entsprechenden Ketonen und 2-Hydroxy-3,5-di-tert.-butyl-anilin (18) hydrolysiert werden.

Bringt man 15 mit Isoglucosamin-hydrochlorid (12) in wasserfreiem Methanol zusammen, so tritt keine Umsetzung ein. 2 bildet sich erst nach Zusatz von Pyridin (11). Wahrscheinlich entsteht zunächst aus 11 und 12 Pyridinium-chlorid (13) und "freies" Isoglucosamin (14). Dieses reagiert mit 15 vermutlich auf dem Wege über die entsprechende Schiffsche Base (16 bzw. 17) zu 18 und 2. (Ob die Reaktion über radikalische Zwischenstufen [19] läuft, wurde nicht untersucht.)

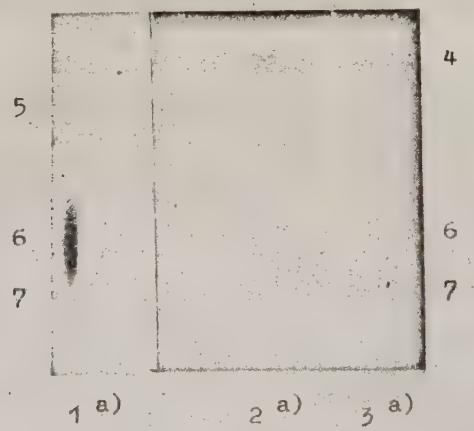
Schüttelt man daher 12 bei 20° mit mindestens 2 Äquivalenten 15 in methanolischer Pyridinlösung 24 Stunden unter Stickstoff (zur Vermeidung von Oxydationen durch Sauerstoff), so bildet sich unter völligem Umsatz von 12 zunächst wenig 2 (Abbildung 5, Seite 20). Läßt man solche Ansätze nach Entfernung des nicht umgesetzten 15 bei p_H 4 und 25° unter Stickstoff stehen, so findet sich nach 4-5 Tagen viel 2 (Abbildung 5). Aus derartigen Ansätzen können 13 und 18 durch Chromatographie an Ionenaustauschern entfernt werden. Anschließend erhält man reines 2 in Ausbeuten bis zu 25 % d. Th. Die Elementaranalyse zeigte, daß das erhaltene 2 teilweise als Hydrat vorliegt, was mit Angaben von anderer Seite [2] gut übereinstimmt. So gewonnene Präparate zeigen neben einem Hauptfleck je



-R= -CHOH-CHOH-CHOH-CH_2OH (D-arabino)
-R'= $-O(CH_3)_3$

nach dem verwendeten chromatographischen System schwache Nebenflecke. Vermutlich handelt es sich dabei um isomere Formen von 2. So erklärt sich, daß das 2 auch bei der hier beschriebenen neuen Darstellungsmethode bisher nur als zäher Sirup erhalten wurde.

Abbildung 5.- Papierchromatographische Untersuchung der Reaktion von Isoglucosamin-hydrochlorid mit 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon in methanolischem Pyridin bei 20°.



1: Glucoson (2) aus D-Glucose-phenylosazon (1) [5]

2: Gemisch aus Isoglucosamin-hydrochlorid (12) und 2 Äquivalenten 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon (15) in methanolischem Pyridin nach 24-stündiger Reaktion

3: Gemisch wie bei 2, nach Entfernung von 15 und 4-tägigem Stehen bei p_H 4 und 25° (unter Stickstoff)

4: 15

5: 1

6: 2

7: Pyridiniumchlorid (13)

---

a) 1 bzw. 2 und 3 wurden in getrennten Chromatogrammen entwickelt; die Flecken wurden durch Besprühen mit unterschiedlichen Reagenzien sichtbar gemacht.
Einzelheiten: Experimenteller Teil.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Ausgangsstoffe

1.1. Isoglucosamin-acetat (5).- Die Substanz wurde nach Vorschrift [17] hergestellt.

1.2. Isoglucosamin-hydrochlorid (12).- Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die zur Synthese von 5 dienende Vorschrift [17]: Zu einer Suspension von 5 g vorhydriertem Palladiumoxidhydrat-bariumsulfat [18] in 50 ml Wasser gab man 26,9 g 1-Desoxy-1-p-tolylamino-D-fructose [27] und 100 ml n HCl. Bei 20° und 1 at wurden in 8 Stunden 5140 ml H_2 aufgenommen. Nach Abzentrifugieren, Waschen des Katalysators mit Wasser und Ausäthern wurde der Überstand i. Vak. zur Trockene gebracht und aus möglichst wenig Wasser/Äthanol umkristallisiert. Schmp.: 118°.

1.3. Ninhydrin (6).- Es wurde Ninhydrin p. a. der Fa. RIEDEL de HAEN (Seelze) verwendet.

1.4. 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon (15).- Die Substanz wurde nach Vorschrift [9] hergestellt.

2. Papierchromatographie

2.1. Papier.- Es wurde das Papier Nr. 2043 b Ugl der Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL (Dassel) verwendet.

2.2. Fließmittel.- Oberschicht von n-Butanol/Pyridin/Benzol/Wasser = 5/3/1/3 (v/v/v/v) [15].

2.3. Sprühreagenzien.-

2.3.1.- Benzidin-Natriummetaperjodat (zum Nachweis von α-Diolen) [21].

2.3.2.- Ninhydrin (zum Nachweis von Aminen) [21].

2.3.3.- Silbernitrat (zum Nachweis reduzierender Verbindungen) [14].

2.3.4.- Anilin-N,N-Diphenylamin-Orthophosphorsäure (zum Nachweis von Glucoson) [14].

2.3.5.- Glutaminsäure (zum Nachweis von Ninhydrin).
0,5 proz. L-Glutaminsäure in H_2O.

3. Ionenaustauscher

Es wurden Ionenaustauscher der Fa. SERVA, Entwicklungslabor (Heidelberg) verwendet.
Kationenaustauscher: Amberlite IR 120 ($H^{\oplus}$); Amberlite CG 120 ($H^{\oplus}$).
Anionenaustauscher: Amberlite IR 45 ($OH^{\ominus}$).

4. Puffer

Tabelle 2.- Puffer beim Umsatz von Isoglucosamin-acetat mit Ninhydrin.

Puffer	p_H a)	Zusammensetzung
I [7]	5,47	44,3 ml 0,1 m Citronensäure + 45,7 ml 0,2 m Na_2HPO_4
II [7]	5,67	42,0 ml 0,1 m Citronensäure + 58,0 ml 0,2 m Na_2HPO_4
III [7]	5,86	39,6 ml 0,1 m Citronensäure + 60,4 ml 0,2 m Na_2HPO_4
IV [24]	6,76	26,4 ml 0,5 m NaH_2PO_4 + 23,6 ml 0,5 m Na_2HPO_4 + 150 ml H_2O
V [24]	6,87	23,4 ml 0,5 m NaH_2PO_4 + 26,6 ml 0,5 m Na_2HPO_4 + 150 ml H_2O
VI [24]	6,90	20,6 ml 0,5 m NaH_2PO_4 + 29,4 ml 0,5 m Na_2HPO_4 + 150 ml H_2O
VII [24]	6,75	57,0 ml m/15 KH_2PO_4 + 43,0 ml m/15 Na_2HPO_4
VIII [24]	6,89	50,8 ml m/15 KH_2PO_4 + 49,2 ml m/15 Na_2HPO_4
IX [24]	6,95	44,8 ml m/15 KH_2PO_4 + 55,2 ml m/15 Na_2HPO_4
X [24]	7,44	7,3 ml 0,5 m NaH_2PO_4 + 42,7 ml 0,5 m Na_2HPO_4 + 150 ml H_2O
XI	6,90	1 m NaH_2PO_4 mit 2 n NaOH titriert
XII	6,90	0,5 m NaH_2PO_4 mit 2 n NaOH titriert
XIII	6,90	0,5 m KH_2PO_4 mit 2 n NaOH titriert
XIV	6,70	0,5 m KH_2PO_4 mit 2 n NaOH titriert
XV	6,70	1 m KH_2PO_4 mit 2 n NaOH titriert

a) Die p_H-Werte wurden elektrometrisch bestimmt

5. Elektrometrische p_H-Messungen

Es wurde ein p_H-Meter der Fa. METROHM (Herisau) und eine Glaselektrode der Fa. SCHOTT (Mainz) verwendet.

6. Natriumsalz von "Ruhemanns Purple"

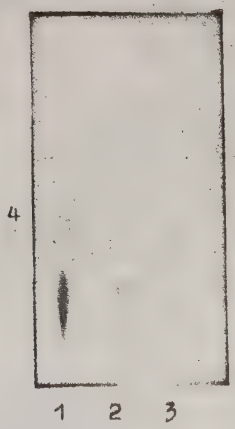
Beispiel für die in der Abbildung 4 angegebene Bestimmung: 2×10^{-4} Mol Isoglucosamin-acetat und 8×10^{-4} Mol Ninhydrin wurden in 7 ml Puffer VI (Tabelle 2, Seite 23) gelöst. Nach 16 Stunden bei 20° wurde der Niederschlag abgesaugt und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Nach Trocknen über $CaCl_2$ bei 20°/12 Torr erhielt man 24,9 mg Farbstoff. Schmp.: $> 300^{\circ}$.

Das Natriumsalz löst sich in Wasser mit blauvioletter und in Eisessig mit weinroter Farbe. Wäßrige Lösungen werden auch in Dunkeln beim Zusatz von Salzsäure oder Isoglucosamin-hydrochlorid innerhalb weniger Stunden farblos. Ohne Zusätze werden wäßrige Lösungen sowohl beim Stehen im Tageslicht, als auch beim Aufbewahren im Dunkeln gelb. Diese gelbe Substanz ist aber nicht identisch mit der auf Seite 7 erwähnten.

7. Synthese von D-Glucoson durch Umsetzung von D-Isoglucosamin-acetat mit Ninhydrin

1 mMol Isoglucosamin-acetat (5) und 1,75 mMol Ninhydrin (6) wurden mit 35 ml Puffer VI (Tabelle 2, Seite 23) bis zur Homogenität geschüttelt. Dann ließ man 135 Stunden bei 20° stehen. Aus der blauviolett werdenden Lösung fiel ein roter Niederschlag aus, der abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen wurde. Das Filtrat wurde mit n-Butanol geschüttelt, bis es gelb war. Dann gab man auf einen Kationenaustauscher (Amberlite IR 120 ($H^{\oplus}$), 20 x 1 cm) und eluierte mit Wasser (1 Tropfen/2 Sek.) bis das Eluat neutral reagierte. Das heller gewordene Eluat wurde auf einen Anionenaustauscher (Amberlite IR 45 ($OH^{\ominus}$), 20 x 1 cm) gegeben. Nach Elution mit viel Wasser (1 Tropfen/2 Sek.) engte man bei 25° i. Vak. ein und trocknete über $CaCl_2$ bei 20°/12 Torr. Der Rückstand 64,1 mg; 27 % d. Th.) ergab mit Phenylhydrazin D-Glucose-phenylosazon (1) vom Schmp. 188°. Fehlingsche Lösung wurde in der Kälte reduziert. Das Präparat enthält neben wenig 2 noch eine gelbe Verbindung (vgl. Seite7), die nicht näher untersucht wurde. Mit Anilin-N,N-Diphenylamin-Orthophosphorsäure (Sprühreagenz 2.3.4., Seite 22) behandelte Chromatogramme zeigten allerdings nur einen blauen Fleck mit einem R_f-Wert wie nach Vorschrift [5] hergestelltes 2, während D-Arabinose einen braunen Fleck mit gleichem R_f-Wert wie 2 ergab (vgl. Abbildung 5, Seite 20, Abbildung 6, Seite 26).

Abbildung 6.- Dünnschichtchromatographie [a] von D-Arabinose, nach Vorschrift [5] hergestelltem und nach 8. (Seite 27) synthetisiertem Glucoson.



1: Glucoson (2) aus D-Glucose-phenylosazon (1) [5]

2: 2, hergestellt nach 8. (Seite 27)

3: D-Arabinose

4: 1

---

a) DC-Karten der Fa. RIEDEL de HAEN (Seelze), Laufmittel: n-Propanol/Essigsäureäthylester/H_2O = 7/2/1 (v/v/v), Kammersättigung [25].

8. Synthese von reinem D-Glucoson durch Umsetzung von D-Isoglucosamin-hydrochlorid mit 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon

215,6 mg Isoglucosamin-hydrochlorid (12) und 440 mg 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon (15) wurden 24 Stunden bei 20° mit 5 ml 0,462 m wasserfreiem methanolischem Pyridin unter N_2 geschüttelt, wobei das zunächst dunkelrote Gemisch dunkelbraun wurde. Man engte bei 25° i. Vak. bis fast zur Trockne ein, suspendierte den Rückstand in wenig Wasser und schüttelte mit Äther aus, bis dieser farblos war. Die gelbliche wäßrige Phase wurde bei 25° i. Vak. soweit eingeengt, bis der p_H-Wert bei etwa 4 lag. Unter N_2 rührte man 4-5 Tage bei 25-30° und gab dann auf einen Kationenaustauscher (Amberlite CG 120 ($H^{\oplus}$), 12 x 1 cm). Man eluierte (1 Tropfen/4 Sek.) mit Wasser, bis das zunächst saure Eluat wieder neutral reagierte. Das Eluat gab man auf eine Säule (20 x 1 cm), die unten zu 1 cm mit Kationenaustauscher (Amberlite CG 120 ($H^{\oplus}$)) und darüber zu 19 cm mit Anionenaustauscher (Amberlite IR 45 ($OH^{\ominus}$)) gefüllt war und eluierte mit viel Wasser (1 Tropfen/1-2 Sek.). Das Eluat wurde bei 20°/12 Torr über $CaCl_2$ eingetrocknet, wobei man einen farblosen Sirup erhielt: 53 mg (25 % d. Th.).

Berechnet für $C_6H_{10}O_6$: C: 40,45 %; H: 5,66 %

Berechnet für $C_6H_{10}O_6 \times H_2O$: C: 36,73 %; H: 6,17 %

Gefunden: C: 39,41 %; H: 5,97 %

Mit Phenylhydrazin ergab sich D-Glucose-phenylosazon (1) vom Schmp. 189-192°. Der Misch-Schmp. mit einem authentischen Präparat zeigte keine Depression.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Umsetzung von Isoglucosamin-hydrochlorid (12) mit 3,5-Di-tert.-butyl-1,2-benzochinon (15) in methanolischem Pyridin wurde erstmalig ein sirupöses Gemisch von Isomeren des reinen, teilweise als Hydrat vorliegenden Glucosons (2) in Ausbeuten bis zu 25 % d. Th. erhalten. Die Konstitution ergab sich aus der Elementaranalyse, den chromatographischen Eigenschaften und der Überführung in D-Glucose-phenylosazon (1).

Das erhaltene Präparat ist bei Perfusionen von Rattenlebern deutlich wirksamer als unreine Präparate, wie sie bei herkömmlichen Darstellungsmethoden gewonnen werden.

Bei der erstmals untersuchten Umsetzung von Isoglucosaminacetat (5) mit Ninhydrin (6) in einem Puffer vom p_H 6,9 erhält man neben dem Natriumsalz von "Ruhemanns Purple" unreines Glucoson in Ausbeuten bis zu 27 % d. Th.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BAYNE, S.: Aldosuloses (Osones), in Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L., Methods in Carbohydrate Chemistry, 2, Academic Press, New York, London (1963): 421-423

2. BAYNE, S. and FEWSTER, J. A.: The Osones, Advanc. Carbohyd. Chem. 11, (1956): 43-96

3. BOND, C. R., KNIGHT, E. C. and WALKER, T. K.: The Production of Glucosone from Carbohydrates by Enzymic Action, Biochem. J. (London) 31, (1937): 1033-1040

4. BREUER, R.: Über das freie Chitosamin, Ber. dtsch. chem. Ges. 31, (1898): 2193-2200

5. BRÜLL, L.: Sulla preparazione degli osoni, Annali di Chimica Applicata, 26, (1936): 415-417
Über die Darstellung der Osone, Chem. ZentBl. I (1937): 1437

6. COREY, E. J. and ACHIWA, K.: A New Method for the Oxidation of Primary Amines to Ketones, J. Amer. Chem. Soc. 91, (1969): 1429-1432

7. D'ANS, J. und LAX, E.: Taschenbuch für Chemiker und Physiker, 2. Aufl., Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, (1949): 1592-1593

8. FISCHER, E.: Über die Verbindungen des Phenylhydrazins mit den Zuckerarten, IV, Ber. dtsch. chem. Ges. 21, (1888): 2631-2634

9. FLAIG, W., FLOETZ, T. und BIERGANS, H.: Zur Kenntnis der Huminsäuren, XIV. Mitteilung, Justus Liebigs Ann. Chem. 597, (1955): 196-213

10. FLAIG, W. und RIEMER, H.: Polarographische Untersuchungen zum Verhalten von Trihydroxytoluolen bei der Reaktion mit Glycin unter oxidierenden Bedingungen, Justus Liebigs Ann. Chem. 746, (1971): 81-85

11. FRIMMER, M.: Toxic Cyclopeptides of the Toadstool Amanita Phelloides and Related Species, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 269, (1971): 152-163

12. FRIMMER, M.: Persönliche Mitteilung vom 26. März 1971

13. FRIMMER, M.: Persönliche Mitteilung vom 13. Dezember 1971

14. HAIS, I.M. und MACEK, K.: Handbuch der Papierchromatographie, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1, (1963): 904, 914

15. HUDSON, M. T. and WOODWARD, G. E.: Glucosone, I. Preparation and Properties, J. Franklin Inst. 264, (1957): 61-68

16. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on the Biochemical Nomenclature (CBN): Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, Part 1, 1969, Eur. J. Biochem. 21, (1971): 455-477

17. KUHN, R. und HAAS, H. J.: Darstellung von D-Isoglucosamin durch katalytische Hydrierung von Amadori-Verbindungen, Aminozuckersynthesen VI, Justus Liebigs Ann. Chem. 600, (1956): 148-155

18. KUHN, R. und HAAS, H. J.: Braunes Palladiumoxydhydrat-bariumsulfat für katalytische Hydrierungen, Angew. Chem. 67, (1956): 785

19. MARUYAMA, K., SUZUE, S. and OSUGI, J.: Spontaneous Electron Transfer from Amines to Simple Quinones in an Aqueous Medium, Bull. Chem. Soc. Japan, 44, (1971): 1161-1162

20. McCALDIN, D. J.: The Chemistry of Ninhydrin, Chem. Rev. 60, (1960): 39-51

21. MERCK, E.: Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Darmstadt, (1970): 71, 75

22. MORELL, R. S. and CROFTS, J. M.: Action of Hydrogen Peroxide on Carbohydrates in the Presence of Ferrous Salts, J. Chem. Soc. 75, (1899): 786-792

23. NEUZIL, E., PRETON, J.-C. et PIAGNOL, H.: La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire, Bull. Éc. nat. Méd. Pharm. Dakar, 7, (1959): 195-211

24. RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York, 2, (1964): 92-103

25. STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, (1962): 477

26. WEIDENHAGEN, R.: Über ein neues Verfahren zur Darstellung von Osonen, Z. Wirtschaftsgruppe Zuckerind. 87, (1937): 711-715 zit. nach Chem. ZentBl. I (1938): 2184

27. WEYGAND, F.: Über N-Glykoside, II. Mitteilung, Amadoriumlagerungen, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, (1940): 1259-1278 zit. nach Chem. ZentBl. I (1941): 205-208

28. WITTMANN, H., MÜLLER, A. K. und ZIEGLER, E.: Neue Reagentien zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren, 6. Mitteilung, Zur Kenntnis der "Ninhydrinreaktion", Mh. Chem. 101, (1970): 1388-1393

DANK

Herrn Prof. Dr. Haas danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas und die vorzügliche Unterstützung bei der theoretischen und experimentellen Bearbeitung.

LEBENSLAUF

Als Sohn des kaufmännischen Angestellten Fritz Schlimmer und dessen Ehefrau Irmgard, geb. Gehlbach, wurde ich am 8. Juni 1948 in Zweibrücken geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule meiner Geburtsstadt.

1959 trat ich in das Staatliche Mathematische Naturwissenschaftliche Gymnasium Zweibrücken ein und legte dort 1967 die Reifeprüfung ab.

Im September 1967 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes, bestand dort 1968 den naturwissenschaftlichen Teil der ärztlichen Vorprüfung und 1970 die ärztliche Vorprüfung.

1973 legte ich ebenfalls an dieser Universität das Staatsexamen ab.